



TITLE:

Elucidation of signal regulation by
interacting molecules and proteins of Ca^{2+}
influx channels(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Sawamura, Seishirou

CITATION:

Sawamura, Seishirou. Elucidation of signal regulation by interacting molecules and proteins of Ca^{2+} influx channels. 京都大学, 2016, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19753>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2017-03-23に公開

京都大学	博士（工学）	氏名	澤村 晴志朗
論文題目	Elucidation of signal regulation by interacting molecules and proteins of Ca ²⁺ influx channels (Ca ²⁺ チャネル相互作用分子によるシグナル伝達制御の解明)		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>生体内に存在する無機イオン濃度は、細胞内外において厳密に制御されている。特に Ca²⁺ は、細胞内情報伝達の 2 次メッセンジャーとして、多様な細胞応答・生理機能に重要な役割を果たしている。Ca²⁺チャネルは、細胞内への Ca²⁺流入経路として主要な役割を担っており、Ca²⁺チャネルを介した細胞内 Ca²⁺濃度上昇は、細胞の生死や遺伝子発現、および細胞分化といった多様な機能を制御することが分かっている。しかしながら、個々の Ca²⁺チャネルによる Ca²⁺依存的細胞内情報伝達（Ca²⁺シグナリング）の分子機構、およびその薬理学的・生理学的意義は、未解明な点が多く残されている。</p> <p>第 1 章では、TRPM2 の酸化ストレス感受性とてんかん発症の関連を明らかにした。TRPM2 チャネルは、ADP-ribose（ADPR）や H₂O₂ といった酸化ストレスによって活性化され、細胞死や炎症細胞遊走といった生物学的過程に重要な役割を果たしている。しかし、TRPM2 を介した酸化ストレスに誘導される細胞死の細胞内機構についてはほとんど解明されていない。本章では、若年性ミオクロニーてんかん（JME）の原因遺伝子として注目を集めている EFHC1 と TRPM2 チャネルの物理的相互作用及び機能的関連について研究を行った。免疫沈降実験から TRPM2 の細胞質 N 末端及び C 末端は EFHC1 と相互作用することが示された。また強制発現系による TRPM2 と EFHC1 との共発現は、H₂O₂ 及び ADPR による TRPM2 を介した Ca²⁺流入及びカチオン電流を増強させ、H₂O₂ に誘導される細胞死を増大させた。これらの効果は、JME に関連する EFHC1 変異体により消失した。さらに、in situ hybridization 実験により TRPM2 と EFHC1 は海馬ニューロン及び脳室に共局在することが示された。以上のことから、EFHC1 は TRPM2 チャネル活性を正に調節することを明らかにし、さらに EFHC1 の JME に関連する変異は、TRPM2 を介した細胞死を抑制することにより、JME 表現型の発現に寄与している可能性が示唆された。</p> <p>第 2 章では、神経栄養効果を示す、TRPC チャネルの新規低分子活性化剤を同定した。神経変性疾患や精神疾患は、有効な治療法がいまだ確立されておらず、その開発が急務である。脳由来神経栄養因子（BDNF）は、これらの疾患モデルにおいて治療効果を示すが、脳内移行性の低さなどの薬物動態特性から、ヒトへの臨床応用が困難であった。本章では、BDNF による受容体刺激の下流で活性化する TRPC チャネルに着目し、その低分子活性化剤を探索することで、BDNF の効果を模倣する低分子化合物を見出すことを目指した。その結果、TRPC3/6/7 チャネルを選択的に活性化し、BDNF と部分的に同一の Ca²⁺シグナリング経路を活性化して、神経突起伸展や神経細胞生存を促進する化合物が得られた。本研究は、低分子の TRPC3/6/7 チャネル活性化剤を同定した初めての報告であり、その神経栄養性効果から、これらの活性化剤は BDNF 様の低分子化合物として、神経疾患に対する治療薬のリード化合物となることが期待される。</p> <p>第 3 章では、ストア作動性 Ca²⁺流入(SOCE)の主要分子 STIM1 の相互作用分子 CCDC92</p>			

京都大学	博士（工学）	氏名	澤村 晴志朗
<p>を見出し、神経系の細胞において転写調節因子として働くことを明らかにした。SOCEは、小胞体 Ca^{2+} ストアの枯渇によって活性化する Ca^{2+} 流入経路の一つであり、受容体刺激時の持続的な Ca^{2+} シグナルに重要な役割を果たしている。特に、免疫細胞などの非興奮性細胞において、主要な Ca^{2+} 流入源として着目されてきた。しかし近年、興奮性細胞である神経細胞においても SOCE が確認され、シナプス可塑性や空間記憶といった神経機能を制御することが示唆されているものの、SOCE による神経機能制御の分子機構は未解明な点が多く残されている。本章では、SOCE の主要分子である STIM の相互作用分子探索を行い、神経系に豊富に発現する機能未知遺伝子 CCDC92 を同定した。CCDC92 は、転写因子に特有なモチーフ構造を有していることが推測された。実際に、CCDC92 は DNA との結合能を示しており、神経様細胞株である PC12 細胞においては、神経分化を促す神経成長因子（NGF）によって Ca^{2+} 依存的に核移行し、転写を制御することを明らかにした。更に、網羅的遺伝子解析の結果、CCDC92 はシナプス形成や神経発達を担う遺伝子の発現を制御することが示唆された。また、STIM および CCDC92 はともに、NGF 刺激による PC12 細胞の神経分化を促進する働きをもつことを明らかにした。以上のことから、新規転写調節因子である CCDC92 が、受容体刺激の下流の SOCE 依存的な遺伝子発現調節を介して神経分化を制御するという、SOCE による新たな神経機能制御機構が示唆された。この研究は、神経発達における SOCE の重要性の解明に繋がることが期待される。</p> <p>第 4 章では、受容体刺激の下流で Ca^{2+} シグナリングと協調して働くリン酸化酵素、プロテインキナーゼ C（PKC）の分子種の一つである $\text{PKC}\delta$ は、多様な細胞機能を制御し、がんを始めとした様々な疾患の創薬ターゲットとして注目されている。特に、δ 分子種に特徴的な核内でのリン酸化活性は、細胞死ストレスによる細胞死の誘導に重要であることが知られているが、その活性調節機構は未解明であった。本章では、$\text{PKC}\delta$ の時空間的な活性の測定を可能とするレポーター分子を開発し、様々な細胞内局所での $\text{PKC}\delta$ の活性を評価した。その結果、形質膜、ゴルジ体およびミトコンドリアといった細胞内局所では、受容体刺激で産生される脂質分子が $\text{PKC}\delta$ の活性に重要であるのに対し、核内では src キナーゼによるリン酸化を受けて活性化するという、局所によって異なる活性調節メカニズムを明らかにした。本研究は、$\text{PKC}\delta$ の時空間的な活性を評価できるレポーターを開発した初めての報告となり、$\text{PKC}\delta$ が担う多様なシグナル伝達機構の解明に役立つことが期待される。</p> <p>以上、本論文は、Ca^{2+} シグナリングに関連する Ca^{2+} チャネル相互作用分子等の機能について実験を行い、TRP チャネル及び SOC チャネル等の新しい薬理的・生理学的機能を明らかにしており、結論では、本論文で得られた成果について要約している。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、 Ca^{2+} 依存的シグナル伝達 (Ca^{2+} シグナリング) が担う多様な薬理学的・生理学的機能の解明を目標に、 Ca^{2+} チャネル相互作用分子が持つ機能を明らかにすることで取り組んだ成果についてまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. TRPM2 の相互作用分子として EFHC1 を同定し、EFHC1 が TRPM2 の活性を増強することで、酸化ストレスによる細胞死を促進することを明らかにした。若年性てんかんに関連した EFHC1 の変異体では、これらの効果が消失したことから、酸化ストレスに対する TRPM2 の応答性の低下が、若年性てんかん発症に関わるという、新たな分子機構が示唆された。
2. TRPC チャネルの低分子活性化剤を同定し、神経細胞において神経栄養性効果を示すことを明らかにした。これらの活性化剤は、低分子 TRPC3/6/7 チャネル活性化剤として初めての報告であり、神経疾患治療薬の新たなリード化合物となることが期待される。
3. ストア作動性 Ca^{2+} チャネルの相互作用分子 CCDC92 を同定し、CCDC92 が Ca^{2+} 流入と関連して転写調節因子として働くことを明らかにした。更に CCDC92 は、神経機能に関わる遺伝子の発現を調節し、神経分化を制御することを明らかにした。これらの知見は、神経系における、ストア作動性 Ca^{2+} 流入の重要性の解明につながることを期待される。
4. Ca^{2+} シグナリングと協調して細胞機能を制御する PKC δ の活性測定レポーターを開発した。このレポーターは、PKC δ の時空間的活性を評価できる初めての分子であり、PKC δ が担う多様なシグナル伝達機構の解明に役立つことが期待される。

以上、本論文は、TRP チャネル及び SOC チャネル等の新規薬理学的・生理学的機能について述べたものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成28年2月22日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。